油橄榄 AP2/ERF 转录因子鉴定及水胁迫表达分析[1]

王丽娟[1,2]，王毅[2*]，陆斌[2]，罗玛妮娅[1, 2]，徐令文[1]，原晓龙[2]，李贤忠[1]
(1. 西南林业大学 林学院，昆明 650224; 2. 云南省林业和草原科学院， 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室，国家林业局云南珍稀濒特森林植物保护和繁育重点实验室， 昆明 650201)

摘 要：为探究 AP2/ERF 基因家族在油橄榄水胁迫中的应答机制，该研究对受干旱及水淹胁迫的‘佛奥’和‘TYZ-1 号’2 个品种的根和叶进行转录组测序，并基于全基因组数据对油橄榄中 AP2/ERF 转录因子的蛋白理化性质、基因结构及系统进化进行分析，同时通过转录组测序数据分析与水胁迫相关的 AP2/ERF 转录因子在两个油橄榄品种中的基因表达差异情况并用荧光定量 PCR 进行验证。结果表明：（1）在油橄榄中鉴定得到 110 个 AP2/ERF 基因家族成员，该 110 个蛋白质所含氨基酸大小为 173-717bp，均不存在信号肽，为非分泌蛋白，将油橄榄 AP2/ERF 与模式植物拟南芥 AP2/ERF 蛋白构建进化树，发现油橄榄 AP2/ERF 蛋白分为 AP2、RAV、ERF 和 Solosist 四个大类，其中 ERF 分为 ERF 和 DREB 两个亚类，ERF 包含 ERF B1~ERF B6 六个子亚类，DREB 包含 DREB A1~DREB A6 六个子亚类，这与模式植物拟南芥 AP2/ERF 的分类一致，每个亚家族同时包含了油橄榄和拟南芥 AP2/ERF 蛋白，说明拟南芥和油橄榄的 AP2/ERF 家族在进化水平上有一定的相似性。（2）基因结构及保守元件分析中发现油橄榄 AP2/ERF 同一亚家族蛋白具有相同的基因结构及保守元件。结合基因表达和进化树中已知水分调控功能的基因初步推测 *OeAP2-75*,*OeAP2-97*, *OeAP2-101*,*OeAP2-23*, *OeAP2-13* 与油橄榄水分调节密切相关，*OeAP2-13*,*OeAP2-28*,*OeAP2-104*, *OeAP2-75*, *OeAP2-80*,*OeAP2-50* 在两个品种中都有不同的表达量，推测这可能是‘佛奥’和‘TYZ-1 号’抗性不同的原因。利用 RT-qPCR 技术检测油橄榄 AP2/ERF 基因在不同胁迫下的表达变化，结果显示 *OeAP2-101*,*OeAP2-28*, *OeAP2-42* 受水胁迫诱导显著上调，这与转录组分析结果一致。该研究结果可为油橄榄 AP2/ERF 家族基因的抗逆性表达及基因功能研究奠定基础，为油橄榄选育抗旱、耐涝砧木品种提供了方法和理论依据。

关键词：油橄榄，AP2/ERF 转录因子，生物信息学，基因表达谱，水分胁迫
中图分类号：S792.95 **文献标识码：**A 文章编号：202103044

Identification and expression analysis of AP2/ERF transcription factor under water stress in *Olea europaea*

WANG Lijuan[1,2], WANG Yi[2*], LU Bin[2], LUO Maniya[1, 2], XU Lingwen[1], YUAN Xiaolong[2], LI Xianzhong[1]
(1. *Southwest Forestry University*, *College of Forestry*, Kunming, 650224; 2. *Key Laboratory of Forest Plant Cultivation and Utilization*, *Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration*, *Yunnan Academy of Forestry & Grassland Science*, Kunming, 650201)

Abstract： In order to explore the response mechanism of AP2/ERF gene family in the water stress of *Olea europaea*, this study performed transcriptome sequencing on the roots and leaves of two cultivars 'Frantoio' and 'TYZ-1' that were under drought and flooding stress. And based on the whole genome data, the protein

基金项目：“十三五”国家重点研发计划(2020YFD1000703)；中央财政林草技术推广项目(云【2021】TG01 号)；云南省林业和草原科学院创新团队基金(LKYTD-2020-001)[Supported by: National keypoint research and invention program of the thirteenth (2020YFD1000703); The forestry and grass technology popularization project financed by the central government (Cloud [2021] No. TG01); Innovation Team Fund of Yunnan Academy of Forestry and Grassland Sciences (LKYTD-2020-001)]。

作者简介：王丽娟（1996-），硕士研究生，主要从事经济林栽培与利用和分子植物育种研究，(E-mail)3281739886@qq.com。
[*]**通信作者：**王毅，博士，副研究员，主要从事植物学和分子生物学研究，(E-mail)22825818@qq.com。

physicochemical properties, gene structure and system evolution of AP2/ERF transcription factor in *O. europaea* were analyzed. At the same time, the difference in gene expression of AP2/ERF transcription factor related to water stress in the two *O. europaea* cultivars was analyzed by transcriptome sequencing data and verified by fluorescence quantitative PCR. The results were as follows: (1) A total of 110 AP2/ERF gene family members were identified in *O. europaea*. The amino acid size of the 110 proteins is 173-717bp, there is no signal peptide and it is a non-secreted protein. The phylogenetic tree was constructed between *O. europaea* AP2/ERF and model plant *Arabidopsis* AP2/ERF protein. It was found that *O. europaea* AP2/ERF protein was divided into four categories: AP2, RAV, ERF and Solosist. Among them, ERF is divided into two subtypes: ERF and DREB. ERF includes six subtypes of ERF B1 to ERF B6, and DREB includes six subtypes of DREB A1 to DREB A6, which is consistent with the classification of the model plant *Arabidopsis* AP2/ERF. Each subfamily contains AP2/ERF proteins of *O. europaea* and *Arabidopsis* at the same time, indicating that the AP2/ERF family of *Arabidopsis* and *O. europaea* are similar in evolution. (2) The analysis of gene structure and conserved elements found that the proteins of the same subfamily of *O. europaea* AP2/ERF have the same gene structure and conserved elements. Combining gene expression with genes with known water regulation functions in the evolutionary tree, it is preliminarily speculated that *OeAP2-75*, *OeAP2-97*, *OeAP2-101*, *OeAP2-23*, *OeAP2-13* are closely related to the water regulation of *O. europaea*, *OeAP2-13*, *OeAP2-28*, *OeAP2-104*, *OeAP2-75*, *OeAP2-80*, *OeAP2-50* have different expression levels in the two varieties. It is speculated that this may be the reason for the different resistance of 'Frantoio' and 'TYZ-1'. The RT-qPCR technique was used to detect the expression changes of *O. europaea* AP2/ERF gene under different stresses. The results showed that *OeAP2-101*, *OeAP2-28*, and *OeAP2-42* were significantly up-regulated by water stress, which was consistent with the results of transcriptome analysis. The results of this study can lay a foundation for the research on the stress resistance expression and gene function of the AP2/ERF family genes of *O. europaea*, and provide a method and theoretical basis for the selection of drought-resistant and flood-tolerant rootstock varieties of *O. europaea*.

Key words: *Olea europaea*, AP2/ERF transcription factor, bioinformatics, gene expression profile, water stress

植物在自然界生长发育和进化的过程中，通常面临着诸如干旱、水淹、极端高低温、高盐等的非生物胁迫，这对植物的生长、发育产生了负面影响。因此植物通过多种信号转导途径使转录因子与下游基因的顺式作用元件相结合，调控下游防卫反应基因的表达，从而在细胞和分子水平上对环境胁迫作出反应(张文慧, 2016)。目前研究发现在非生物胁迫中起重要作用的转录因子包括 AP2/ERF、WRKY、NAC、MYB、ZFP、bHLH 等家族(Xu et al., 2011)。

AP2/ERF 是植物中最大的转录因子家族之一，涉及植物的生长发育及各个生理过程，参与植物非生物胁迫调控机制，AP2/ERF 家族蛋白的主要特征是含有 1 个或 2 个 AP2 结合域，每个 AP2 结合域约含 58~70 个氨基酸残基(Cao et al., 2020)。根据 AP2 家族蛋白结构域中特征元件的种类和数量不同可将其分为 AP2、ERF、RAV、Soloist 4 个亚家族(Wu et al., 2015)，各个亚家族在植物体内有不同的功能，AP2 亚家族包含 2 个 AP2 保守结构域，主要与植物生长发育及细胞生长分化有关(纪晴等，2018)，RAV 含有 1 个 AP2 结构域和 1 个 B3 DNA 结合域，通常在乙烯、芸苔素内酯及一些生物和非生物胁迫中起作用(柯希望等, 2020)；ERF 和 Soloist 只包含 1 个 AP2 结构域，其中，ERF 又分为 DREB 和 ERF 两个亚类，通常与植物的生物胁迫、干旱、高盐、低温、热胁迫、多重胁迫相关(刘志薇等，2014；苟艳丽等，2020)。大量研究证明了 AP2/ERF 转录因子在植物生长发育及非生物胁迫中起关键的调控作用，例如沙柳(*Salix cheilophila*) *SpsDREB8* 基因在干旱胁迫下表达下调(王雷等，2021)，拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中转入甘薯(*Ipomoea batatas*)的 *IbRAP2-12* 基因提高其植株的耐盐性和抗旱性(Li et al., 2019)，过表达 *OsERF71* 提高水稻(*Oryza*

sativa)的耐旱性(Ahn et al., 2017)。随着近年植物基因组数据相继公布，发现不同植物中 AP2/ERF 转录因子的数量不同，比如中国樱花(*Cerasus serrulata*)中鉴定出了 68 个 AP2/ERF 转录因子家族成员(Zhu et al., 2021)，鸭茅(*Dactylis glomerata*)和白桦(*Betula platyphylla Suk*)中分别有 193 个和 45 个 AP2/ERF 转录因子家族成员(Xu et al., 2020; 张文慧等，2020)，但目前对油橄榄(*Olea europaea*)基因组中的 AP2/ERF 转录因子的研究未见报道。

油橄榄为木犀科(*europaea*)木犀榄属(*Olea*)油料作物，原产于地中海沿岸，适应夏季长、热、干燥，冬季温和多雨的半干旱气候(Amira et al., 2020)，是世界著名的亚热带果树和重要经济林木(牛二利等，2021)，其全身是宝，橄榄叶和橄榄油中富含多种有益活性物质，易于人体吸收(程子彰等，2014)，橄榄油在西方被誉为"液体黄金"，是世界上唯一直接采用鲜果冷榨工艺 以自然形态榨取的木本植物油(邓从静等，2011)。随着社会经济发展，橄榄油消费需求急剧增长，橄榄油市场长期供不应求、价格居高不下(赵梦炯等，2021)。云南油橄榄栽培由于引种地和原产地生态条件差异还面临很多问题，夏季湿润多雨，冬季干旱的气候与原产地气候正好相反，因此选育夏季耐涝、冬季抗旱的油橄榄砧木品种是解决云南油橄榄栽培问题的关键。该研究基于课题组前期田间试验结果田园 1 号(TYZ-1 号)在水胁迫下抗逆性强于'佛奥'，为探究 2 个品种抗逆性差异的原因，该文对油橄榄 AP2/ERF 基因进行挖掘鉴定，并分析其蛋白理化性质、系统发育及水胁迫下的基因表达模式，为进一步研究油橄榄 AP2/ERF 家族基因的抗逆性表达及功能基因的挖掘奠定基础，也为油橄榄选育抗旱、耐涝砧木品种提供了方法和理论依据。

研究发现油橄榄 AP2/ERF 基因家族包含 110 个成员，分类与模式植物拟南芥一致，其在进化水平上有一定的相似性。AP2/ERF 家族中转录因子的数量不但与物种的基因组有关，还与植物长期进化过程中外界环境的影响有关，与枣(*Ziziphus jujuba*)基因家族中 145 个(李继东等，2020)，银杏(*Ginkgo biloba*)中 61 个(袁红慧等，2020)，杨柳(*Salix arbutifolia*)中 173 个(Rao et al., 2015)AP2/ERF 家族成员相比，油橄榄中 AP2/ERF 转录因子的数量属于中等类型，这一结果推测油橄榄在自然进化过程中，AP2/ERF 基因家族受到一定的外部环境压力。

1 材料与方法

1.1 试验材料获取及转录组测序

试验材料为油橄榄'TYZ-1 号'和'佛奥'一年生扦插苗，由云南省林业和草原科学院树木园提供('TYZ-1 号'是绿化用的油橄榄种子通过杂合培育出的实生苗中选育的优良无性系，其耐瘠薄、抗旱耐涝性强。'佛奥'是我国通过国家审定的油橄榄良种，中国油橄榄适生区大都有种植，但抗逆性不强)。试验前期选取 2 个品种油橄榄各 30 株幼苗分干旱、水淹及对照组。于 2019 年 9 月 3 日开始，对 2 个品种扦插苗进行干旱、水淹及正常培养处理，2019 年 9 月 8 日采集不同处理（干旱、水淹、对照）下油橄榄('TYZ-1 号'、'佛奥')扦插苗的叶片和根各 3 个混合样。所采集的样品当即处理后用液氮速冻，-80℃下保存，按照 RNA 试剂盒(Qiagen)说明提取 RNA，以 RNA 为模板合成 cDNA，并构建文库。委托上海派森诺生物科技有限公司利用二代测序技术(Next-Generation Sequencing，NGS)基于 Illumina 测序平台对样品文库进行双末端(Paired-end，2*150bp，PE)测序。

1.2 OeAP2/ERF 蛋白序列的获取

油橄榄的全基因组数据从 NCBI 上下载，搜索获得油橄榄 AP2/ERF 转录因子的 cDNA 序列及蛋白序列，利用 NCBI 进行 BLAST 同源序列比对及蛋白结构域分析，除去无 AP2/ERF 结构域的蛋白序列。

1.3 OeAP2/ERF 蛋白理化性质分析

利用 ExPASy protparam tool 在线软件分析 AP2/ERF 蛋白理化性质，通过 signalP-5.0 和 Euk-mPLoc 2.0 server 预测蛋白的信号肽和亚细胞定位，利用 Prabi 在线软件(NPS@：SOPMA secondary structure

prediction)预测蛋白的二级结构。

1.4 OeAP2/ERF 蛋白进化树构建及保守元件和基因结构分析

利用 MEGA X 以及 Figtree 将来自于油橄榄和拟南芥 AP2/ERF 蛋白序列构建进化树构建及修饰，执行参数为 None。油橄榄 AP2/ERF 家族蛋白分类参考拟南芥 AP2/ERF 家族蛋白的分类方法，拟南芥蛋白序列从拟南芥基因数据库下载(https://www.arabidopsis.org/download/index-auto.jsp? dir=%2Fdownload_files% 2FProteins)，利用 MEME (http://meme.nbcr.net/meme/tools/ meme)对 110 个 OeAP2/ERF 蛋白保守结构域进行预测，具体参数设置如下：基序位点分布情况，选择重复次数不限制；保守性基序的数目限制选择 6，其他参数均采用默认值。

1.5 OeAP2/ERF 水分胁迫基因表达谱分析

通过有参转录组测序获得油橄榄 AP2/ERF 转录因子基因表达谱，利用派森诺基因云在线软件作基因表达交互热图。非生物胁迫基因表达谱数据的处理及筛选采用 FPKM 对表达量进行标准化，保留所有 FPKM 值数据，对其进行排序，删除 FPKM 无变化或者变化范围不超过 5 倍的数据，筛选出基因表达量变化最大的 15 个基因。

1.6 实时定量荧光 PCR

为了验证转录组测序的结果及目标基因的表达模式，设计特异引物(表 1)，tubulin 作为内参基因，经荧光定量 PCR 检测油橄榄 OeAP2 基因在‘TYZ-1 号’和‘佛奥’不同处理下的表达情况。用 SYBR Green (invitrogen)检测特异引物的 PCR 产物。25 ul 反应体系的可选参数如下：2× SYBR 绿色主混合物 12.5 µL，上下游引物(10 um/l)0.5 µL，模板(cDNA)1 µL，ddH$_2$O 10.5 µL。使用 PCR 热循环仪(ABI 7300; 应用生物系统, Foster City, CA, USA)。PCR 反应程序：变性程序(95 ℃, 10 min)，放大定量程序重复 45 次(95℃, 15 s; 57℃, 10 s; 72 ℃, 15 s; 单次荧光测量)，熔化曲线程序(60 ℃至 95 ℃, 加热速度 0.1 ℃, 连续荧光测量)，最后冷却至 40 ℃。以 tubulin 基因作为基因正常表达的内部调控因子，通过 qPCR 分析每个样品 3 个独立的生物学重复和每个生物学重复的 3 个技术重复。

表 1 油橄榄荧光定量检测引物序列

Table 1 Sequence of the primers for fluorescent quantitative detection of *Olea europaea*

引物名称 Primer name	序列 sequence 5'-3'
OeAP2-101F	CAACAATTCCAGCTCCTCCA
OeAP2-101R	CTGCTTCTTCAGCTGTGTT
OeAP2-55F	TACAGAGGAATCCGCATGAG
OeAP2-55R	CGACAATTCATGACATACTT
OeAP2-42F	TCAAGGTGGATCTGTGAGGA
OeAP2-42R	ATCACTGCTTATATATCGCA
OeAP2-28F	TCAGATATATGCCAACCATC
OeAP2-28R	TGACCTACTTGGGCTCGTGC
OeAP2-23F	GAGGAATATGTACAGAGGCA
OeAP2-23R	AGTCGAAGGTGGCGGATTGT
tubulinF	AGATGATGATGACGAGTATG
tubulinR	GACGATGTATCCGTCTATCA

2 结果与分析

2.1 有参转录组测序数据整理

油橄榄‘TYZ-1 号’及‘佛奥’在干旱、水淹、正常浇水下的根与叶共 12 组文库经上机测序，得到图像文件，由 Illumina 测序平台自带软件进行转化，生成 FASTQ 的原始数据(Raw Data)，对每个样品的下机数据(Raw Data)分别进行统计，包括样品名、Q30、模糊碱基所占百分比、以及 Q20(%)和 Q30(%)，统计结果见表 1。测序数据结果显示，所有样品 Rcads 总数在 38 191 054~46 939 278 之间；碱基总数在 5 728 658 100 bp 以上；Q20 碱基百分比均大于 96.91 %；Q30 碱基百分比均在 92.2 %以上；模糊碱基所占比例在 0.000 769 %以下，后经数据过滤去除这些带接头、低质量的 Reads。

表 2 测序数据统计

Table 2 Sequencing data statistics

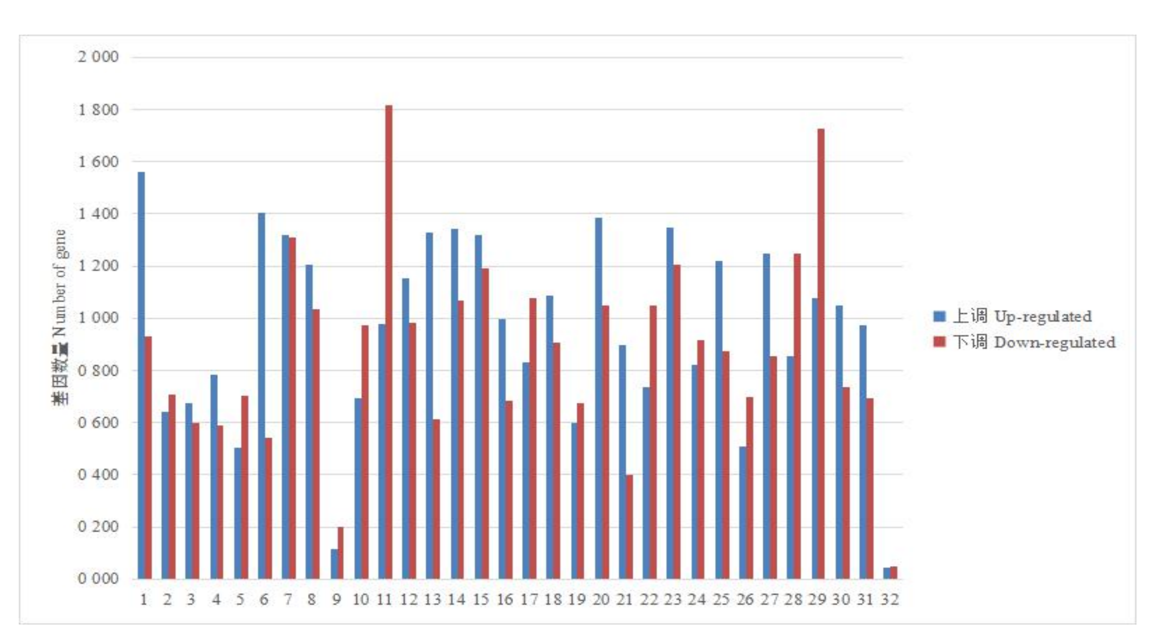
样品名 Sample	Reads 总数 Total number of Reads	碱基总数 Bases (bp)	碱基准确率 99%以上碱基总数 Q30 (bp)	模糊碱基百分比 N (%)	碱基准确率 99 %以上的碱基所占百分比 Q20 (%)	碱基准确率 99.9 %以上的碱基所占百分比 Q30 (%)
FDL	45 048 662	6 791 084 042	6 304 559 475	0.000 268	97.36	92.83
FDR	46 939 278	7 074 531 496	6 522 903 901	0.000 291	96.91	92.2
ODL	44 538 262	6 725 277 562	6 240 276 298	0.000 25	97.29	92.78
ODR	45 559 988	6 866 263 812	6 337 361 057	0.000 283	96.94	92.29
FSR	38 716 652	5 807 497 800	5 481 226 288	0.000 556	97.97	94.38
FSL	42 434 914	6 365 237 100	6 014 466 495	0.000 75	98.02	94.48
OSR	43 986 834	6 598 025 100	6 247 047 129	0.000 768	98.08	94.68
OSL	41 168 206	6 175 230 900	5 834 000 945	0.000 749	98.03	94.47
FR	41 814 712	6 272 206 800	5 901 059 489	0.000 758	97.83	94.08
FL	42 041 262	6 306 189 300	5 982 899 942	0.000 764	98.21	94.87
OR	38 191 054	5 728 658 100	5 429 155 675	0.00 076	98.11	94.77
OL	41 495 232	6 224 284 800	5 912 636 170	0.000 769	98.24	94.99

F 表示‘佛奥’；O 表示‘TYZ-1 号’；D 表示干旱；S 表示水淹；R 表示根；L 表示叶片。

F stands for 'Frantoio'; O stands for 'TYZ-1'; D is for drought; S is for flooding ;R is the root; L is the leaf.

2.2 样品基因差异表达分析

采用 DESeq 对基因表达进行差异分析，表达差异倍数 |log2FoldChange| > 1，显著性 p< 0.05。不同条件下的样品进行两两比较，图 1 为干旱胁迫下油橄榄 2 个品种基因表达差异分析结果簇状柱形图，图 2 为水淹胁迫下油橄榄 2 个品种基因表达差异分析结果簇状柱形图，图 1 中 FDR 与 FDL 之间差异基因数量最少，差异基因总数为 92 个，上调差异基因数为 45 个，下调差异基因数为 47 个；FR 与 OL 之间差异基因数最大，这是两个品种在正常浇水下的根与叶之间的基因表达差异分析，差异基因总数为 2 803 个，上调差异基因数有 1 076 个，下调差异基因数有 1 727 个。图 2 中 OSR 与 OR 之间差异基因数最少为 1 550 个，上调差异基因数有 693 个，下调差异基因数有 857 个；除 FR 与 OL 外，FR 与 FL 之间差异基因数最大为 2 791 个，上调差异基因数为 976 个，下调差异基因数为 1 815 个。由上述数据得知，在干旱和水淹胁迫下油橄榄不同品种中根与叶之间的差异基因数量较明显。



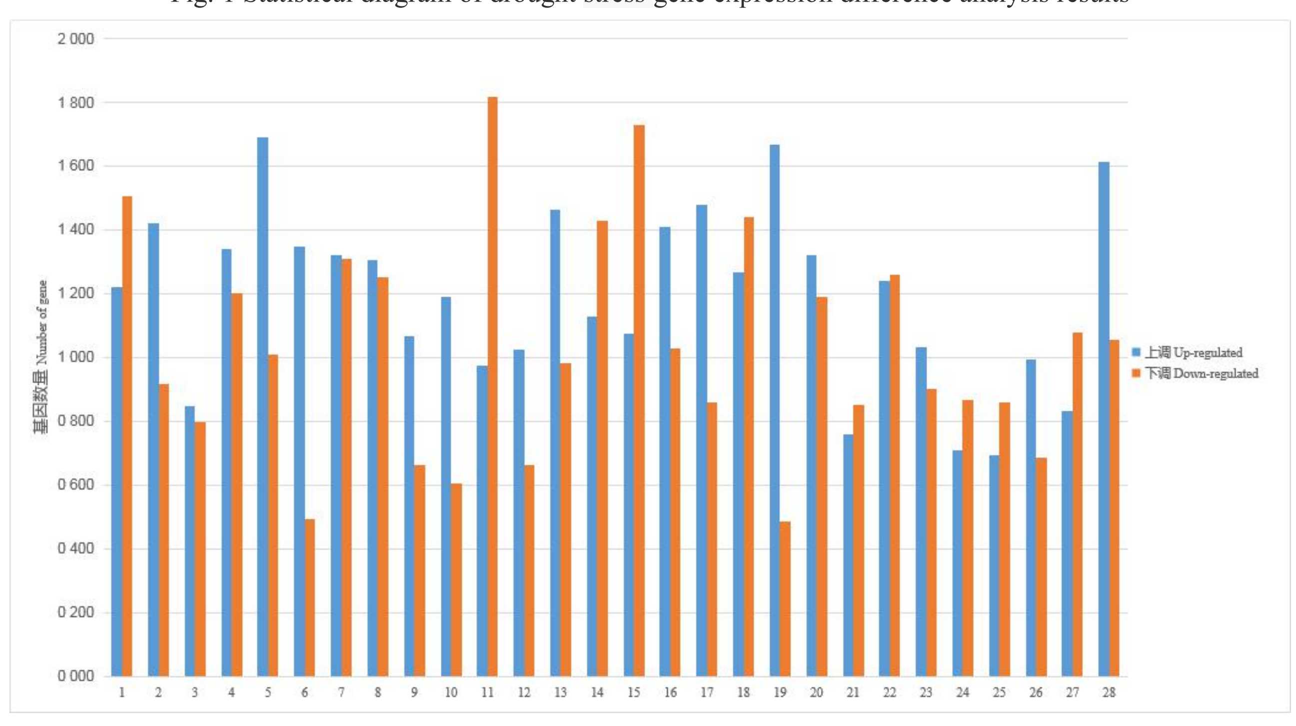
F 表示'佛奥'；O 表示'TYZ-1 号'；D 表示干旱；R 表示根；L 表示叶片。下同。

F stands for 'Frantoio'; O stands for 'TYZ-1'; D is for drought; R is the root; L is the leaf. The same below.

1.ODL vs FR; **2**. FDL vs ODR; **3**. OL vs FDL; **4**. FDL vs OR; **5**. FDL vs ODL; **6**. FDR vs FR; **7**. OR vs OL; **8**. ODR vs FL; **9**. FDR vs ODR; **10**. OL vs ODL; **11**. FR vs FL; **12**. FDR vs FL; **13**. ODR vs FR; **14**. ODR vs ODL; **15**. FL vs OR; **16**. FL vs OL; **17**. FR vs OR; **18**. FDR vs ODL; **19**. FDL vs OL; **20**. ODR vs OL; **21**. FDL vs FR; **22**. OR vs FDR; **23**. ODL vs OR; **24**. ODL vs FL; **25**. FDR vs OL; **26**. FDL vs FL; **27**. ODR vs OR; **28**. OR vs ODR; **29**. FR vs OL; **30**. FDR vs OR; **31**. ODL vs OL; **32**. FDR vs FDL

图 1 干旱胁迫下基因表达差异分析结果统计图

Fig. 1 Statistical diagram of drought stress gene expression difference analysis results



S 表示水淹 S is for flooding

1. OSR vs OSL; **2**. FSR vs OSL; **3**. FSL vs OSL; **4**. FSL vs OSR; **5**. FSL vs FR; **6**. FSR vs OSR; **7**. OR vs OL; **8**. OSL vs OR; **9**. FSL vs OL; **10**. FSR vs OR; **11**. FR vs FL; **12**. OSL vs OL; **13**. FSR vs FSL; **14**. OSR vs FL; **15**. FR vs OL; **16**. FSR vs FL; **17**. FSR vs OL; **18**. OSR vs OL; **19**. FSR vs FR; **20**. FL vs OR; **21**. FSL vs FL; **22**. FSL vs OR; **23**. OSR vs FR; **24**. OSL vs FL; **25**. OSR vs OR; **26**. FL vs OL; **27**. FR vs OR; **28**. OSL vs FR

图 2 水淹胁迫下基因表达差异分析结果统计图

Fig. 2 Statistical diagram of water-out stress gene expression difference analysis results

2.3 油橄榄 AP2/ERF 转录因子家族成员鉴定及理化性质分析

本研究从油橄榄全基因组中搜索 AP2/ERF 基因，共鉴定出 110 个成员，该 110 个蛋白质所含氨基酸大小为 173-717bp，平均氨基酸个数为 344 个。通过 ExPASy protparam tool 分析 OeAP2/ERF 蛋白理化性质，110 个 OeAP2/ERF 蛋白中 37 个蛋白的 PI 大于 7，平均 PI 为 6.63；有 4 个 AP2/ERF 转录因子(OeAP2-97、OeAP2-6、OeAP2-28、OeAP2-109)不稳定系数小于 40，为稳定蛋白，其余 106 个为不稳定蛋白(不稳定系>40)；110 个 OeAP2/ERF 蛋白的脂肪族系数均小于 100；预测蛋白信号肽，发现 110 个 OeAP2/ERF 蛋白都不存在信号肽，为非分泌蛋白；亚细胞定位中有 56 个 OeAP2/ERF 蛋白定位于细胞核中，28 个定位于细胞质中，25 个同时定位于细胞质和细胞核中，OeAP2-85 定位于细胞质和线粒体中；预测二级结构发现 OeAP2/ERF 蛋白无规则卷曲为主要结构，α-螺旋为次要结构。

2.4 OeAP2/ERF 蛋白进化分析与分类

从拟南芥基因库下载拟南芥 AP2/ERF 转录因子，根据 Wu 等(2015)对拟南芥 AP2/ERF 转录因子的分类，从每个大类中挑选 1-12 个 AP2/ERF 转录因子作为参照。利用 MEGA X 对油橄榄 110 个 AP2/ERF 转录因子蛋白及拟南芥 32 个 AP2/ERF 蛋白进行系统进化树构建及分析，结果如图 3 所示，AP2/ERF 蛋白总体分为四类，其中与拟南芥 AP2 类聚在一起包含两个 AP2 保守结构域的成员共有 21 个，被分为 AP2 类；另外两个成员(OeAP2-28、OeAP2-87)包含 1 个 AP2 结构域和 1 个 B3 结合域，与拟南芥 RAV 聚在一个分支上，属于 RAV 类；拟南芥中 Solosist 类蛋白与 RAV 类聚在一起，而在 RAV 类和 Solosist 类旁有一个单独的分支 OeAP2-60，推测其属于油橄榄中 Solosist 类成员，单独分支可能是 Solosist 与 AP2/ERF 转录因子家族其他成员差距较大；其余的 86 个成员都包含 1 个 AP2 保守结构域，同属于 ERF 类，ERF 类中又包含 ERF 和 DREB 两个亚类，分别与拟南芥 ERF 和 DREB 聚在一起，总共分为 12 个亚组，ERF 分为 ERF B1~ERF B6，DREB 分为 DREB A1~DREB A6，除了 Solosist 外，其余每个亚组中都同时包含了 AtAP2/ERF 和 OeAP2/ERF 蛋白，说明拟南芥和油橄榄的 AP2/ERF 家族在进化水平上有一定的相似性。



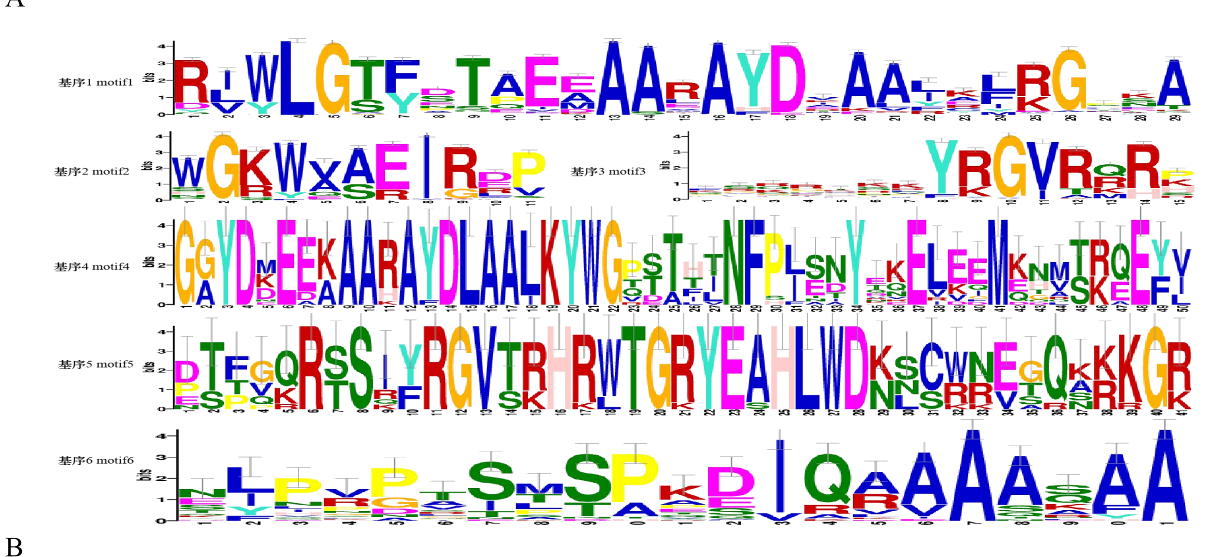
图 3 油橄榄与拟南芥 AP2/ERF 家族系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the AP2/ERF family of *Olea europaea* and *Arabidopsis*

2.5 油橄榄 AP2/ERF 保守元件及基因结构分析

利用 MEME 对 OeAP2/ERF 进行保守元件分析，得到相关性最高的 6 个保守元件如图 4 所示，所有的 OeAP2/ERF 都包含 motif 1，说明 motif 1 是油橄榄 AP2/ERF 的保守结构域，油橄榄 AP2/ERF 转录因子的保守元件及基因结构还与其分类相关，在油橄榄 AP2/ERF 分类中的 AP2 类转录因子 100%包含 motif 1，96.4%包含 motif 2，89.7%包含 motif 3，55.2%包含 motif 4，37.9%包含 motif 5；RAV 类只包含 motif 1，可能是由于在进化过程中发生了变异，导致该类转录因子与其他成员之间没有共同的保守基序；ERF 类均包含 motif 1，motif 2 和 motif 3；DREB 类均包含 motif 1，motif 2 和 motif 6，每一亚类中的保守基序位置大致相同，基因结构也一致，说明油橄榄 OeAP2/ERF 在进化过程中的高度保守性。

A



B



A. 保守元件；B. 基因结构。

A. Conserved element；B. Gene structure.

图 4 油橄榄 AP2/ERF 基因家族保守元件和基因结构分析

Fig.4 Analysis of conserved elements and gene structure of *Olea europaea* AP2/ERF gene family

2.6 油橄榄 AP2/ERF 水分胁迫基因表达谱分析

通过基因表达谱作出水胁迫基因表达交互热图(图 5)，油橄榄 AP2/ERF 家族成员中共检测到 100 个基因表达，未检测到 *OeAP2-29*、*OeAP2-30*、*OeAP2-40*、*OeAP2-56*、*OeAP2-59*、*OeAP2-72*、*OeAP2-81*、*OeAP2-87*、*OeAP2-88*、*OeAP2-105* 基因的表达，推测这 10 个基因未参与水胁迫响应。干旱胁迫下，与正常浇水相比，‘佛奥’叶片中 40%基因表达上调，27%的基因无表达，33%的基因表达下调，根部 33%基因表达上调，9%基因表达量无变化，58%基因表达下调；而‘TYZ-1 号’与正常浇水相比，叶片中有 32%基因表达上调，39%基因表达量无变化，29%基因表达下调，根部中 36%基因表达上调，15%基因表达量无差异，49%基因表达下调；在水淹胁迫下，‘佛奥’根部基因表达量与正常浇水相比，42%基因表达上调，9%基因表达量无变化，49%基因表达下调，叶片中 30%的基因表达上调，40%的基因表达量不变，30%的基因表达下调；‘TYZ-1 号’在水淹胁迫下与正常浇水相比，55%的基因在根部中表达上调，11%的基因在根部表达无变化，44%的基因在根部中表达下调，叶片中 29%的基因表达上调，39%的基因表达无变化，32%的基因表达下调。未受胁迫时，‘TYZ-1 号’基因本底表达普遍高于‘佛奥’(绿色块多于‘佛奥’)，胁迫后‘TYZ-1 号’基因表达量变化不显著，色块普遍较浅，而‘佛奥’胁迫后深色块多于‘TYZ-1 号’，表明‘佛奥’基因上调或下调表达量变化较显著。根据基因表达谱，我们从中筛选出 15 个在干旱胁迫下表达量变化较大的干旱胁迫相关基因(*OeAP2-13*,*OeAP2-33*,*OeAP2-28*,*OeAP2-104*,*OeAP2-82*,*OeAP2-86*,*OeAP2-42*,*OeAP2-23*,*OeAP2-75*,*OeAP2-10*,*OeAP2-80*,*OeAP2-101*,*OeAP2-79*,*OeAP2-50*,*OeAP2-97*) 与 15 个水淹胁迫下表达量变化较大的基因(*OeAP2-23*,*OeAP2-13*,*OeAP2-101*,*OeAP2-75*,*OeAP2-80*,*OeAP2-12*,*OeAP2-28*,*OeAP2-17*,*OeAP2-50*,*OeAP2-55*,*OeAP2-104*,*OeAP2-14*,*OeAP2-97*,*OeAP2-2*,*OeAP2-91*)，发现有 9 个相同的基因(*OeAP2-13*,*OeAP2-28*,*OeAP2-104*,*OeAP2-23*,*OeAP2-75*,*OeAP2-80*,*OeAP2-101*,*OeAP2-50*,*OeAP2-97*)共同调控干旱与水淹胁迫，这 9 个基因可能与水分胁迫调控相关。

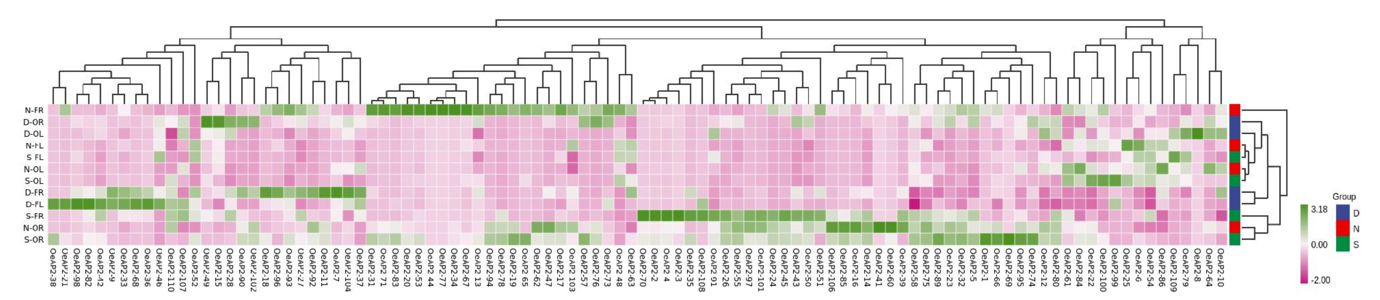
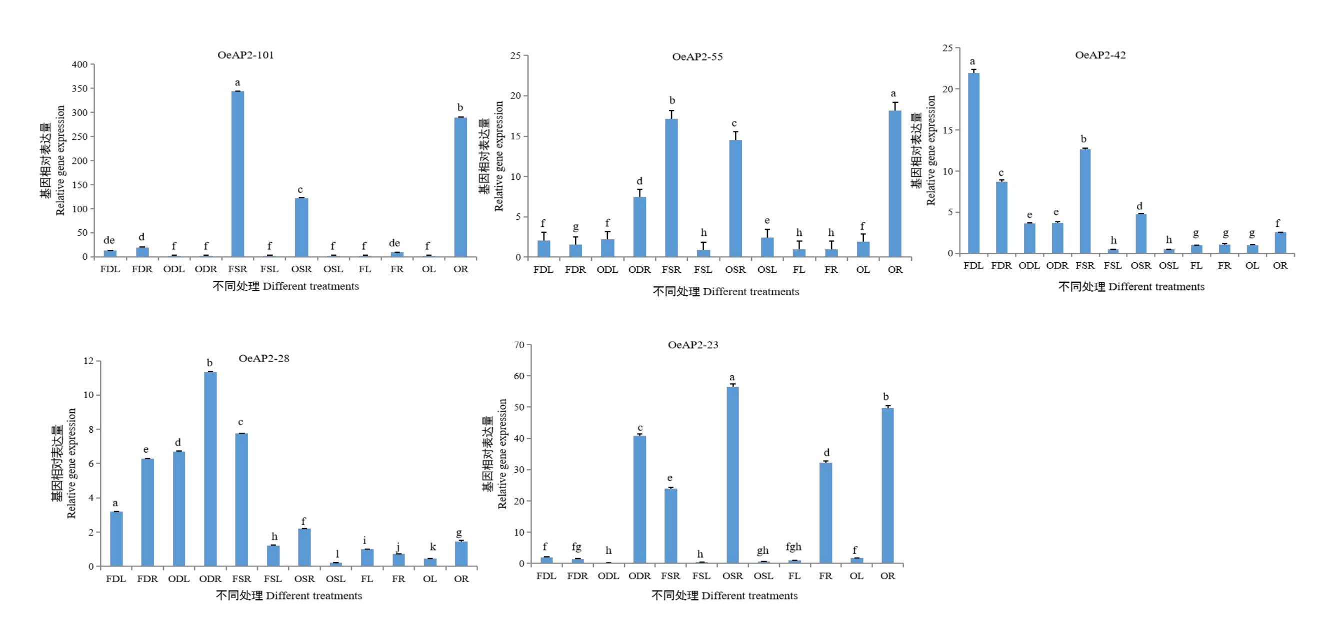


图 5 油橄榄 AP2/ERF 水分胁迫基因表达交互热图

Fig. 5 Interactive heat map of *Olea europaea* AP2/ERF gene expression under water stress

2.7 油橄榄 AP2/ERF 基因 qRT-PCR 分析

经特异引物 tubulinF 和 tubulinR 检测反转录得到油橄榄 cDNA，采用 qRT-PCR 分析油橄榄 AP2/ERF 基因在 FDL、FDR、ODL、ODR、FSR、FSL、OSR、OSL、FL、FR、OL、OR 中的具体表达情况，结果显示(图 6)，OeAP2/ERF 基因在 FDL、FDR、ODL、ODR、FSR、FSL、OSR、OSL、FL、FR、OL、OR 中表达量差异显著，与正常浇水处理相比，*OeAP2-28* 在 ODR 中表达量差异显著，*OeAP2-42* 在 FDL 中表达量差异显著，*OeAP2-101*、*OeAP2-55*、*OeAP2-42*、*OeAP2-28* 在 FSR 中均呈高水平表达。



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著；相同小写字母表示在 0.05 水平上差异不显著。

Different lowercase letters mean significant differences at the 0.05 level; Same lowercase letters mean no significant differences at the 0.05 level.

图 6 OeAP2/ERF 基因在水胁迫下的表达情况

Fig. 6 The expression of OeAP2/ERF gene under water stress

3 讨论

用已知功能蛋白作用机制预测未知功能蛋白作用机制是研究物种未知功能蛋白作用机制的一种方法。本研究将油橄榄 AP2/ERF 在水胁迫下具有表达量的 ERF 亚类蛋白与番茄(*Solanum lycopersicum*) *SlERF5*(Pan et al., 2012)，转基因大豆(*Glycine max*) *GmDREB2A*，水稻 *OsAP37*、*HRE1*、*HRE2*、*JERF1* 和 *OsERF109*(Oh et al., 2009; Francesco et al., 2010; Zhang et al., 2010; Yu et al., 2017)，拟南芥 *DREB2A*(Yoh et al., 2006)，沙柳 *SpsDREB8*(王雷等，2021)等此类水分调节功能基因共同构建蛋白系统进化树(图 7)，发现水胁迫基因表达谱中基因表达量变化较大的 5 个基因(*OeAP2-75*,*OeAP2-97*, *OeAP2-101*,*OeAP2-23*, *OeAP2-13*)聚在同一分支上，且该分支中包含 3 个已知具有水分调节功能的基因(*HRE1*,*JERF1*,*HRE2*)，由此可推测 *OeAP2-75*,*OeAP2-97*, *OeAP2-101*,*OeAP2-23*, *OeAP2-13* 与 *HRE1*,*JERF1*,*HRE2* 具有相似调节功能，可能与油橄榄水分调节密切相关。通过实时荧光定量 PCR 检测，结果表明 *OeAP2-101* 基因在 FSR 及 OSR 中表达量差异显著，*OeAP2-23* 在 OSR 中表达量差异显著，*OeAP2-42* 在 FDL 中表达量差异显著，水胁迫下 *OeAP2-28* 在 2 个品种的叶片和根部表达量均有显著性差异，*OeAP2-101*、*OeAP2-55*、*OeAP2-42*、*OeAP2-28* 在 FSR 中均呈高水平表达，这进一步说明 OeAP2/ERF 参与油橄榄水胁迫响应。

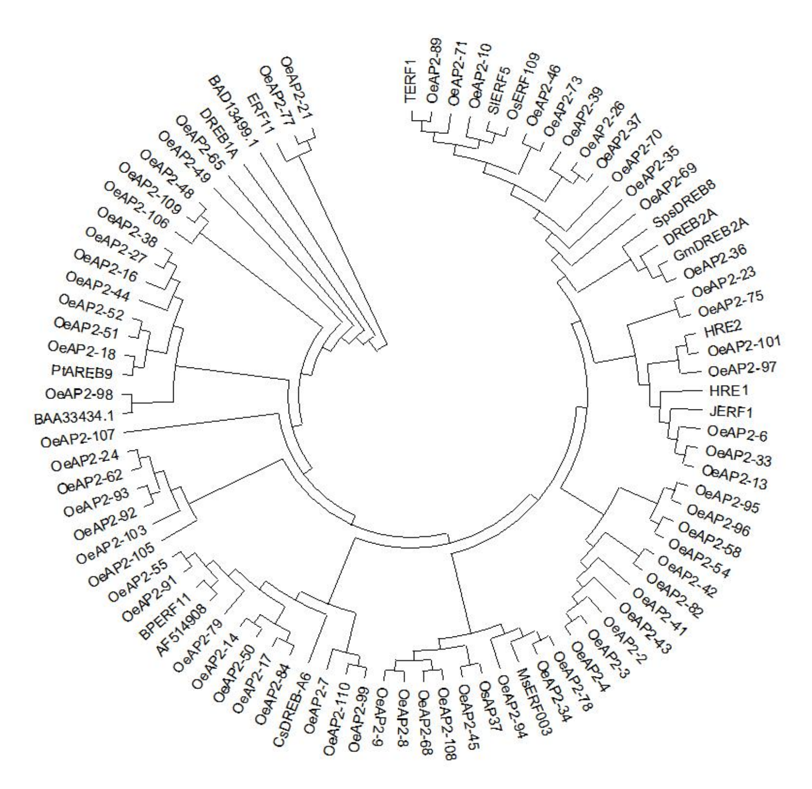


图 7 水分胁迫中具有表达量的 OeAP2/ERF 蛋白与其他植物 AP2/ERF 水分调控因子进化关系

Fig.7 Evolutionary relationship between OeAP2 /ERF proteins expressed in water stress and AP2/ERF water regulatory factors in other plants

该研究中基因表达谱分析发现 9 个共同参与干旱与水淹调节的基因(*OeAP2-13*,*OeAP2-28*,*OeAP2-104*,*OeAP2-23*,*OeAP2-75*,*OeAP2-80*,*OeAP2-101*,*OeAP2-50*,*OeAP2-97*)，这 9 个基因在油橄榄水胁迫(干旱、水淹)下根与叶的表达量与非胁迫下根与叶的表达量有较大的差异。与非胁迫条件下的基因表达量相比，水淹胁迫下 *OeAP2-13* 在‘佛奥’中表达下调，在‘TYZ-1 号’中表达上调；水胁迫下的 *OeAP2-28* 在‘佛奥’和‘TYZ-1 号’的根与叶中均表达上调；*OeAP2-75* 在干旱胁迫下 2 个品种的不同组织中均下调表达；*OeAP2-101* 在干旱胁迫下‘TYZ-1 号’中明显下调表达，在水淹胁迫下‘佛奥’根部明显上调表达；*OeAP2-104* 在干旱胁迫下 2 个品种不同组织中均上调；*OeAP2-23*, *OeAP2-80*,*OeAP2-50*,*OeAP2-97* 在水胁迫(干旱、水淹)下不同组织中表达量都有显著差异，这些基因在不同组织中表达量的不同可能就是‘佛奥’和‘TYZ-1 号’抗逆性差异的原因。转录组数据中 NR 基因功能注释表明这 9 个基因均为乙烯响应因子，通过调控乙烯合成关键基因的表达，从而调节乙烯的生物合成和信号传导。*OeAP2-13*,*OeAP2-75*,*OeAP2-23*,*OeAP2-101*,*OeAP2-97* 在油橄榄 AP2/ERF 蛋白系统进化树中属于 ERF B2 亚族成员，Maren 等(2015)研究报道乙烯响应因子是激素和胁迫信号的一个重要调节中心，ERF B2 亚族成员在低氧和淹水反应中发挥重要作用((Bui et al., 2015)，Xu 等研究发现 *Sub1A-1*(ERF 亚族 B2 亚组成员之一)超表达的同时促进乙醇脱氢酶基因上调表达, 抑制 *Sub1C*(水淹不耐受基因)的转录水平, 表明 *Sub1A-1* 在淹水胁迫应答调控中起关键作用(Xu et al., 2006)。*OeAP2-13* 在油橄榄中的表达模式与 *Sub1A-1* 相似，在耐涝品种‘TYZ-1 号’中表达上调，不耐涝品种‘佛奥’中表达下调，推测 *OeAP2-13* 在‘TYZ-1 号’中也通过促进乙醇脱氢酶基因上调表达，从而增强‘TYZ-1 号’耐涝性。洪林等(2020)研究发现 RAVs 和 AP2s 调控植物的非生物胁迫响应，拟南芥 RAV1，RAV1L 和 RAV2 在干旱胁迫下表达水平下降(Fu et al., 2014)，Saito 等(2004)发现过表达 RAV1 抑制 ABA 降解基因(*CYP707A1* 和 *CYP707A2*)的活性，从而实现不依赖 ABA 的途径调控植物的非生物胁迫响应，该研究中 *OeAP2-28*,*OeAP2-104*, *OeAP2-80* 在 OeAP2/ERF 蛋白系统进化树中属于 RAV, AP2 亚族成员，在干旱胁迫

下同样表达下调，推测其通过促进或抑制干旱胁迫相关酶的表达从而调控油橄榄干旱调控。

AP2/ERF 转录因子在植物胁迫中调控机制较复杂，其启动子包含 ABRE(ABA 反应元件结合蛋白)、DREB(干旱应答元件结合蛋白)、乙烯等顺式作用元件(Zhao et al., 2018; 韩妙华等，2020)，Sanjana 等(2016)研究显示在植物胁迫中，DREBs 和 ABREs 等与胁迫相关的顺式作用元件可以和 NAC 转录因子结合从而应对植物胁迫，Cao 等(2020)研究发现 DREB 结合 WRKY 转录因子共同调节小沙冬青(*Ammopiptanthus nanus*)低温和干旱胁迫，这一研究表明 DREB、ABRE 作为顺式作用元件，可同时调节 AP2/ERF、NAC 和 WRKY 转录因子从而应对植物非生物胁迫(Takasaki et al., 2010; 巩檑等，2013)。AP2/ERF、WRKY、NAC 转录因子在植物水分调控中扮演十分重要的角色，过表达 *TaWRKY10*、*VaWRKY14* 提高拟南芥及转基因烟草耐旱性(Wang et al., 2017; Zhang et al., 2018)；*GmDREB2A* 参与大豆水分亏缺调节(Marinho et al., 2019)，*OsAP37*、*JERF1*、*OsERF109* 的过表达提高水稻抗旱性(Oh et al., 2009; Zhang et al., 2010; Yu et al., 2017)；*ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072* 能使转基因植株抗旱性增强(Tran et al., 2004)，过表达 *SNAC1* 增强转基因棉花(*Gossypium spp*)的耐旱性(Liu et al., 2014)；这充分说明了 AP2/ERF、WRKY、NAC 转录因子与植物的水胁迫相关，并且在水胁迫中发挥重要作用，由此可推测植物体内 WRKY、NAC 转录因子通过与 AP2/ERF 中水相关顺式作用元件结合从而共同调节水胁迫。课题组前期研究发现 WRKY 和 NAC 转录因子参与油橄榄水胁迫调控，并且可能与内源激素 ABA 表达水平相关，由此可推测在油橄榄水胁迫响应机制中，DREBs、ABREs 作为顺式作用元件，同时调节 AP2/ERF、WRKY 和 NAC 转录因子从而共同调控油橄榄水胁迫。由于目前对油橄榄水胁迫响应机制及胁迫相关基因的综合研究还比较有限，我们对‘TYZ-1 号’和‘佛奥’2 个品种的油橄榄进行了转录组测序，后续将结合全基因组重测序以揭示油橄榄水胁迫关键基因及潜在遗传和相关突变，为油橄榄分子辅助育种提供理论依据。

参考文献

AHN H, JUNG I, SHIN SJ, et al., 2017. Transcriptional Network Analysis Reveals Drought Resistance Mechanisms of AP2/ERF Transgenic *Rice*[J]. Front Plant Sci, 8: 1-18.

AMIRA Z, SAHAR N, AMIRA Z, et al., 2020. Phytochemical profile, cytotoxic, antioxidant, and allelopathic potentials of aqueous leaf extracts of *Olea europaea*[J]. Food Sci Nutr.,8(9):1-9

BUI LT, GIUNTOLI B, KOSMACZ M, et al., 2015. Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Sci, 236, 37 – 43.

CAO S, WANG Y, LI X., et al., 2020. Characterization of the AP2/ERF Transcription Factor Family and Expression Profiling of DREB Subfamily under Cold and Osmotic Stresses in *Ammopiptanthus nanus*[J]. Plants, 9(4)455: 1-20.

CHENG ZZ, HE JS, ZHAN MM, et al., 2014. Synthesis of oil during growth and maturation of *olive* fruit. Sci Silv Sin., 50(05):123-131.[程子彰，贺靖舒，占明明，等，2014. 油橄榄果生长与成熟过程中油脂的合成[J]. 林业科学，50(5)：123-131.]

DENG CJ, YU XF, CHEN J., et al., 2011. Processing technology and quality evaluation of *olive* oil[J]. China for pro ins, 38(1):62-63.[邓丛静，于小飞，陈军，等，2011. 橄榄油的加工工艺及品质评价[J]. 林产工业，38(1):62-63.]

FRANCESCO L, JOOST T, VAN D, et al., 2010. *HRE1* and *HRE2* , two hypoxia - inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J., 62(2): 302-315.

FU MJ, KANG HK, SON SH, et al., 2014. A subset of *Arabidopsis* RAV transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA[J]. Plant Cell Physiol, 55, 1892 – 1904.

GOU YL, ZHANG L, GUO H, et al., 2020. Research progress on the AP2/ERF transcription factor in plants[J].

Pratac Sci., 37(6):1150-1159. [苟艳丽，张乐，郭欢，等，2020. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J]. 草业科学，37(6)：1150-1159.]

GONG L, SHI L, SONG YX, et al., 2013. Research progress on drought stress responsive transcription factors in crops[J].Chin Agric Sci Bull., 29(30):10-17. [巩檑，石磊，宋玉霞，等，2013. 农作物旱胁迫响应相关转录因子的研究进展[J]. 中国农学通报，29(30):10-17.]

GIRI MK, SWAIN S, GAUTAM JK, 2014. The *Arabidopsis thaliana At4g13040* gene, a unique member of the AP2/EREBP family, is a positive regulator for salicylic acid accumulation and basal defense against bacterial pathogens[J]. J Plant Physiol.,171(10): 860-867.

HAN MH, TEN RM, LI H, et al., 2020. Cloning of *CsDREB-A2* transcription factor gene and it's response to abiotic stress in *Camellia sinensis*[J]. Acta Agric Nucl Sin., 34(12):2647-2657. [韩妙华，滕瑞敏，李辉，等，2020. 茶树 CsDREB-A2 转录因子基因的克隆与非生物胁迫响应分析[J]. 核农学报，34(12)：2647-2657.]

HONG L, YANG L,YANG HJ etal., 2020. Research advances in AP2/ERF transcription factors in regulating plant responses to abiotic stress[J]. Chin Bull Bot., 55(4):481-496.[洪林，杨蕾，杨海健，等，2020. AP2/ERF 转录因子调控植物非生物胁迫响应研究进展[J]. 植物学报，55(4):481-496.]

JI Q, ZHOU F, ZHOU J, et al., 2018. Whole genome identification and bioinformatics analysis of AP2/EREBP transcription factors of *Ziziphus jujube* [J]. Genom Appl Biol, (7): 2983-2997. [纪晴，周凡，周军，等，2018. 枣 AP2/EREBP 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学，(7)：2983-2997.]

KE XW., ZHANG JP, LIU GH, et al., 2020. Identification of Adzuki bean AP2 /ERF gene family and expression analysis in response to rust infection[J]. Acta Phytopathol Sin., 50(4): 16-34. [柯希望，张金鹏，刘国辉，等，2020. 小豆 AP2/ERF 基因家族鉴定及其应答锈菌侵染的表达分析[J]. 植物病理学报，v.50(4)：16-34.]

LI JD, NI J, YE X, et al., 2020. Genomic identification of jujube AP2/ERF transcription factors and their expression pattern during *Jujube* witches broom pathogenesis process[J]. Acta Hortic Sin., 47(8): 1463-1474. [李继东，倪静，叶霞，等，2020. 枣 AP2/ERF 转录因子鉴定及其响应枣疯病植原体表达分析[J]. 园艺学报，47(8)：1463-1474.]

LI Y, ZHANG H, ZHANG Q, LIU QC, et al., 2019. An AP2/ERF gene, *IbRAP2-12*, from sweetpotato is involved in salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Sci, 281: 19-30.

LIU GZ, LI XL, JIN SX, et al., 2014. Overexpression of *rice* NAC gene *SNAC1* improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic *cotton*, PLoS ONE, 9(1): e86895.

LIU ZW, XIONG YY, LI T, et al., 2014. Isolation and expression profiles analysis of two ERF subfamily transcription factor genes under temperature stresses in *Camellia sinensis*[J]. Acta Phytophysiol Sin., 50(12):1821-1832. [刘志薇，熊洋洋，李彤，等，2014. 茶树中两个 ERF 类转录因子的分离及不同茶树中温度胁迫的响应分析[J]. 植物生理学报，50(12)：1821-1832.]

MAREN M, SERGI MB, 2015. Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling[J]. Plant Physiol, 169:32-41.

MARINHO JP, COUTINHO ID, LAMEIRO RF, et al., 2019. Metabolic alterations in conventional and

genetically modified *soybean* plants with *GmDREB2A*;2 FL and *GmDREB2A*;2 CA transcription factors during water deficit[J]. Plant Physiol Biochem., 140: 122-135.

NIU EL, FU YL, LIU LE, et al., 2021. Screening of outstanding *Olea europaea* varieties and compatable pollinizers for southern China[J]. Acta Agric Nucl Sin., 35(4): 960-968. [牛二利，傅玉楼，刘丽娥，等，2021. 南方油橄榄适宜良种及其授粉品种筛选[J]. 核农学报，35(4)：960-968.]

OH SJ, KIM YS, KWON CW, PARK HK, et al., 2009. Overexpression of the transcription factor *AP37* in *Rice* improves grain yield under drought conditions[J]. Plant Physiol., 150(3): 1368-1379.

PAN Y, SEYMOUR GB, LU CG, et al., 2012. An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in *tomato*[J]. Plant Cell Rep., 31(2): 349-360.

RAO GD, SUI JK, ZENG YF, et al., 2015. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Salix* arbutifolia[J]. FEBS open bio, 5: 132-137.

SANJANA N, HIMANSHU T, GANAPATHI TR, 2016. Expression analysis of *MusaNAC68* transcription factor and its functional analysis by overexpression in transgenic *banana* plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 125(1): 59-70.

TAKASAKI H, MARUYMA K, KIDOKORO S, et al., 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor *OsNAC5* regulates stress-inducible genes and stress tolerance in *rice*[J]. Mol genet genomics, 284(3):173-183.

TRAN LP, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, et al., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter[J], Plant Cell, 16(9): 2481-2498.

WANG C, DENG PY, CHEN LL, et al., 2017. A wheat WRKY transcription factor *TaWRKY10* confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic *tobacco*[J]. PLoS ONE,8(6):e65120-1-13.

WANG L, ZHANG X, LI AY, et al., 2021. Cloning and expression analysis of *SpsDREB8* gene in *Salix Psammophila*[J]. Mol Plant Breed.:1-11[2021-02-28].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210107.1656.014.html. [王雷，张鑫，李安玉，等，沙柳 SpsDREB8 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种：1-11[2021-02-28]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210107.1656.014.html.]

WU ZJ, LI XH, LI ZW, et al., 2015. Transcriptome-based discovery of AP2/ERF transcription factors related to temperature stress in *tea* plant (*Camellia sinensis*)[J]. Funct Integr Genomics, 15(6): 741-752.

XU KN, XU X, FUKAO T, et al., 2006. *Sub1A* is an ethylene-response-factorlike gene that confers submergence tolerance to *rice*[J]. Nature, 442, 705-708.

XU L, FENG GY, YANG ZF, et al., 2020. Genome-wide AP2/ERF gene family analysis reveals the classification, structure, expression profiles and potential function in *orchardgrass* (*Dactylis glomerata*)[J]. Mol Biol Rep., 47(prepublish): 5225-5241.

XU ZS, CHEN M, LI LC, et al., 2011. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement[J]. J Integr Plant Biol, 53(7): 570-585.

YOH S, KYONOSHIN M, YURIKO O, et al., 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression[J]. Plant Cell, 18(5): 1292-1309.

YUAN HH, LI LL, CHEN H, et al, 2021. Identification of AP2/ERF transcription factors in *Ginkgo biloba* and the expression analysis of ERF gene family under adversity stresses[J]. Mol Plant Breed.: 1-19 [2021-02-28].http://kns-cnki-net--bjmu.bjmu.toyss.me:8001/kcms/detail/46.1068.S.20201222.0909.002.html.

[袁红慧，李琳玲，程华，等，2021. 银杏 AP2/ERF 转录因子鉴定及其 ERF 家族在逆境胁迫下的表达分析[J]. 分子植物育种：1-19[2021-02-28]. http://kns-cnki-net--bjmu.bjmu.toyss.me:8001/kcms/detail/46.1068.S.20201222.0909.002.html.]

YU YW, YANG DX, ZHOU SR, et al., 2017. The ethylene response factor *OsERF109* negatively affects ethylene biosynthesis and drought tolerance in *rice*[J]. Protoplasma, 254(1): 401-408.

ZHANG LL, CHENG J, SUN XM, et al., 2018. Overexpression of *VaWRKY14* increases drought tolerance in *Arabidopsis* by modulating the expression of stress-related genes[J]. Plant Cell Rep, 37(8):1159-1172.

ZHANG WH, 2016. Regulation mechanism of *BpERF11* gene from*Betula platyphylla* response to severe salt and drought stress[D]. Northeast Forestry University. [张文慧，2016. 白桦 BPERF11 基因响应高盐干旱胁迫的调控机理研究[D]. 东北林业大学]

ZHANG WH, HUANG Y, HE DM, et al., 2020. Bioinformatic analysis on AP2 /ERF genes from *Betula platyphylla*[J]. J West China For Sci., 49(6): 112-117+136. [张文慧，黄勇，贺登美，等，2020. 白桦 AP2/ERF 家族基因的生物信息学分析[J]. 西部林业科学，49(6)：112-117+136.]

ZHANG ZJ, LI F, LI DJ, et al., 2010. Expression of ethylene response factor *JERF1* in *rice* improves tolerance to drought[J]. Planta, 232(3): 765-774.

ZHAO H, ZHAO X, LI M, et al., 2018. Ectopic expression of limonium bicolor (Bag.) kuntze DREB (*LbDREB*)results in enhanced salt stress tolerance of transgenic *Populus Ussuriensis* Kom[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult., 132(1): 123-136.

ZHAO MJ, WU WJ, JIANG CY, et al., 2021. *Olive* Germplasm Resources Development in Turkey: Status and Enlightenment[J]. World For Research Sci. 34(1):102-106. [赵梦炯，吴文俊，姜成英，等. 土耳其油橄榄种质资源发展现状与启示[J]. 世界林业研究，34(1)：102-106.]

ZHU YY, LIU XL, GAO YD, et al., 2021. Transcriptome-based identification of AP2/ERF family genes and their cold-regulated expression during the dormancy phase transition of *Chinese cherry flower* buds[J]. Sci Hortic, 275: 1-12.